

(19) 【発行国】 日本国特許庁 (JP)

(19) [Publication Office] Japanese Patent Office (JP)

(12) 【公報種別】 公開特許公報 (A)

(12) [Kind of Document] Japan Unexamined Patent Publication (A)

(11) 【公開番号】 特開平 6 - 1 5 3 9 9 6

(11) [Publication Number of Unexamined Application] Japan Unexamined Patent Publication Hei 6 - 153996 -

(43) 【公開日】 平成 6 年 (1 9 9 4) 6 月 3 日

(43) [Publication Date of Unexamined Application] 1994 (1994) June 3 days

(54) 【発明の名称】 ポリヌクレオチド検出法

(54) [Title of Invention] POLYNUCLEOTIDE DETECTION METHOD

(51) 【国際特許分類第 5 版】

(51) [International Patent Classification 5th Edition]

C12Q 1/68 A 7823-4B

C12Q 1/68 A 7823-4B

1/70 7823-4B

1/70 7823-4B

G01N 33/50 P 7055-2J

G01N 33/50 P 7055-2J

33/58 A 7055-2J

33/58 A 7055-2J

【審査請求】 未請求

[Request for Examination] Examination not requested

【請求項の数】 8

[Number of Claims] 8

【全頁数】 9

[Number of Pages in Document] 9

(21) 【出願番号】 特願平 4 - 3 0 9 0 3 7

(21) [Application Number] Japan Patent Application Hei 4 - 309037

(22) 【出願日】 平成 4 年 (1 9 9 2) 1 1 月 1 8 日

(22) [Application Date] 1992 (1992) November 18 day

(71) 【出願人】

(71) [Applicant]

【識別番号】 0 0 0 0 0 5 1 0 8

[Applicant Code] 000005108

【氏名又は名称】 株式会社日立製作所

[Name] HITACHI LTD. (DB 69-054-1503)

【住所又は居所】 東京都千代田区神田駿河台四丁目 6 番地

[Address] Tokyo Chiyoda-ku Kanda Surugadai 4-Chome 6

(71) 【出願人】

(71) [Applicant]

【識別番号】 5 9 1 0 8 3 3 3 6

[Applicant Code] 59108336

【氏名又は名称】 株式会社ビー・エム・エル

[Name] KK B. * M * L.

【住所又は居所】 東京都渋谷区千駄ヶ谷 5 丁目 2 1 番 3 号

[Address] Tokyo Shibuya-ku Sendagaya 5-Chome 21 turn 3 number

(72) 【発明者】

(72) [Inventor]

【氏名】 岡野 和宣

[Name] Okano Kazunobu

【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪 1 丁目 2 8 0 番地 株式会社日立製作所中央研究所内

[Address] Inside of Tokyo Kokubunji City Higashi Koigakubo 1-Chome No 280 area Hitachi Ltd. (DB 69-054-

(72) 【発明者】

【氏名】村川 克二

【住所又は居所】東京都国分寺市東恋ヶ窪 1 丁目 2 8
0 番地 株式会社日立製作所中央研究所内

(72) 【発明者】

【氏名】永井 啓一

【住所又は居所】東京都国分寺市東恋ヶ窪 1 丁目 2 8
0 番地 株式会社日立製作所中央研究所内

(72) 【発明者】

【氏名】神原 秀記

【住所又は居所】東京都国分寺市東恋ヶ窪 1 丁目 2 8
0 番地 株式会社日立製作所中央研究所内

(72) 【発明者】

【氏名】杉浦 正彦

【住所又は居所】東京都杉並区高円寺南 1 丁目 3 4 番
5 号 株式会社ビー・エム・エル内

(72) 【発明者】

【氏名】片山 和彦

【住所又は居所】東京都杉並区高円寺南 1 丁目 3 4 番
5 号 株式会社ビー・エム・エル内

(74) 【代理人】

【弁理士】

(57) 【要約】

【構成】 標的 RNA を標識物で標識すると共に、リボソームを固定した担体を用い該標的 RNA を捕捉することを特徴とする RNA 検出方法。標的 DNA を標識物で標識し該標的 DNA を、担体に固定したリボソーム及びリンカーポリヌクレオチドのうちのリンカーポリヌクレオチド部位にハイブリダイズさせてリボソームを固定した担体に捕捉することを特徴とする標的 DNA の検出方法。上記検出方法に用いる蛍光検出装置。

【効果】 本発明により、放射性同位元素を用いずに

1503) Central Research Laboratory

(72) [Inventor]

[Name] Murakawa Katsuji

[Address] Inside of Tokyo Kokubunji City Higashi Koigakubo 1-Chome No 280 area Hitachi Ltd. (DB 69-054-1503) Central Research Laboratory

(72) [Inventor]

[Name] Nagai Keiichi

[Address] Inside of Tokyo Kokubunji City Higashi Koigakubo 1-Chome No 280 area Hitachi Ltd. (DB 69-054-1503) Central Research Laboratory

(72) [Inventor]

[Name] Karbara Hideki

[Address] Inside of Tokyo Kokubunji City Higashi Koigakubo 1-Chome No 280 area Hitachi Ltd. (DB 69-054-1503) Central Research Laboratory

(72) [Inventor]

[Name] Sugiura Masahiko

[Address] Inside of Tokyo Sugina mi-ku Koc rji Minami 1-Chome No. 34 5 number KKB. * M * L.

(72) [Inventor]

[Name] Katayama Kazuhiko

[Address] Inside of Tokyo Sugina mi-ku Koc rji Minami 1-Chome No. 34 5 number KKB. * M * L.

(74) [Attorney(s) Representing All Applicants]

[Patent Attorney]

(57) [Abstract]

[Constitution] As target RNA labeling is done with label, making use of support which locks ribosome RNA detection method which designates that trapping it does said target RNA as a target, hybridize doing in linker polynucleotide site inside ribosome and linker polynucleotide which the labeling do target DNA with label and lock said target DNA, in support in the support which locks ribosome trapping detection method of target DNA which designates that it does as a target, fluorescence detection apparatus which is used for above mentioned detection method.

[Effect(s)] With this invention, without using correspond

試料中のウイルスなどの被測定ポリヌクレオチドを感度よく定量測定することが可能となる。さらに、本発明では、ランダムアクセスが可能な自動化に適した標的ポリヌクレオチド測定法が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 標的ポリヌクレオチドがRNAであって、該標的RNAを標識物で標識するとともに担体に固定して標的RNAを検出する方法において、リボソームを固定した担体を用い該標的RNAを捕捉することを特徴とするポリヌクレオチド検出方法。

【請求項2】 標的ポリヌクレオチドがDNAであって、該標的DNAを標識物で標識し担体に捕捉して検出する方法において、リボソームを固定した担体を用いるとともに該リボソームに、該リボソームと結合するRNA配列及び前記標的DNAに相補的なリンカーポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを結合し、かつ前記リンカーポリヌクレオチドと前記標的DNAとをハイブリダイズさせてポリヌクレオチド会合体を形成させることにより、標的DNAを捕捉することを特徴とする標的ポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項3】 RNAがRNAウイルスであることを特徴とする特許請求範囲1記載のポリヌクレオチド検出方法。

【請求項4】 リボソームが真核生物のリボソームあるいは原核生物のリボソームであることを特徴とする請求項1記載のポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項5】 リボソームが真核生物のリボソームあるいは原核生物のリボソームであることを特徴とする請求項2記載のポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項6】 標識物が蛍光体であることを特徴とする請求項1記載のポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項7】 標識物が蛍光体であることを特徴とする請求項2記載のポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項8】 少なくとも一種以上の励起光を発射する光源、該光源から発射された励起光のビーム径を拡大するビームエクspander、ビーム径が拡大された励起光を一定方向に曲折させるとともに反応担体が発する蛍光を透過させることのできる鏡、当該鏡により

ending radioactive element virus or other suffering measurement polymers in sample sensitivity to be good quantification it becomes possible to do. Furthermore, with this invention, target polynucleotide measurement method which is suitable for the automation where random access is possible is offered.

[Claim(s)]

[Claim 1] Target polynucleotide being RNA, as said target RNA labelling is done with the label, locking in support, regarding to method which detects the target RNA, making use of support which locks ribosome polynucleotide detection method which designates that trapping it does said target RNA as a feature.

[Claim 2] Target polynucleotide being DNA, being. In method where labelling it does said target DNA with label and the trapping does in support and detects regarding. As support which locks ribosome is used by connecting polynucleotide which includes complementary linker polynucleotide in RNA sequence and aforementioned target DNA which can connect with said ribosome to said ribosome, at same time they hybridize doing aforementioned linker polynucleotide and aforementioned target DNA, if forms polynucleotide aggregate, detection method of target polynucleotide which designates that the trapping it does target DNA as a feature.

[Claim 3] Polynucleotide detection method which is stated in patent claim 1 which designates that RNA is RNA virus as a feature.

[Claim 4] Detection method of polynucleotide which is stated in Claim 1 which designates that ribosome is ribosome of eukaryote or ribosome of prokaryotic organism as a feature.

[Claim 5] Detection method of polynucleotide which is stated in Claim 2 which designates that ribosome is ribosome of eukaryote or ribosome of prokaryotic organism as a feature.

[Claim 6] Detection method of polynucleotide which is stated in Claim 1 which designates that the label is phosphor as a feature.

[Claim 7] Detection method of polynucleotide which is stated in Claim 2 which designates that the label is phosphor as a feature.

[Claim 8] Excitation light of at least one kind is discharged light source, Expands beam diameter of excitation light which is discharged from said light source the beam expander - which excitation light where beam diameter is expanded as it bends in constant direction

曲折させた励起光を架台上に載置した反応担体上に照射するための集光レンズ、反応担体が発する蛍光を検出する蛍光検出機構、反応担体の下部に該反応担体を透過した励起光を受けるフォトダイオード、前記フォトダイオードの信号が最大となるように反応担体を載置した架台を一定方向に駆動する駆動機構、前記蛍光検出機構からの信号をフォトダイオードからの位置情報と同期させて計数する装置からなることを特徴とする蛍光検出装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、疾病の原因となるウイルス、リケッチャ、細菌等の外来性ポリヌクレオチド、あるいは、細胞中の遺伝子発現を担うmRNA、並びに特定の遺伝子部位の検出方法並びに該検出方法に用いる蛍光検出装置に関する。

【0002】

【従来の技術】 標的となるポリヌクレオチド（DNAまたはRNA）試料を固相に捕捉する方法、並びに、血液や排泄物等の試料中の細菌やウイルス等の外来性の標的ポリヌクレオチドを検出する方法が、特開昭58-31998に開示されている。この方法では、試料中のポリヌクレオチドを加熱等により変性させて一本鎖とした後、これを、ニトロセルロース膜に固定する。次に、検査したい細菌やウイルスのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列を持つ放射性同位元素標識されたポリヌクレオチドプローブを反応させた後、この膜を洗浄する。もし、試料中に細菌やウイルスのポリヌクレオチドが含まれていれば、これに標識ポリヌクレオチドプローブがハイブリダイゼーション反応により会合して膜上に残る。これをオートラジオグラフィにより検出することで標的ポリヌクレオチドの有無を判定できる。

【0003】 標的となるポリヌクレオチド（DNAまたはRNA）試料を固相に捕捉する他の方法は、アナリティカル バイオケミストリー 198巻（1991年）、138頁から142頁（Søren Richard Rasmussen et al. Anal

transmitting fluorescence which reaction support gives out it is possible, mirror. To irradiate on reaction support which mounts excitation light which bends with this said mirror on stage condenser lens in order, fluorescence which reaction support gives out is detected fluorescence detection mechanism. In order for signal of photodiode and aforementioned photodiode which receive excitation light which transmitted said reaction support in the bottom of reaction support to become maximum, position information and the synchronization from photodiode doing signal from drive mechanism and the aforementioned fluorescence detection mechanism which drive stage which mounts reaction support in constant direction, counting fluorescence detection apparatus which detects that it consists of equipment which is done as a structure.

[Description of the Invention]

[0001]

[Field of Industrial Application] This invention, virus and jp9 ケツ Thea sinensis L. (tea) which become cause of disease, bacteria or other adventitious poly jp10 post レオ jp8 F, or, regards fluorescence detection apparatus which is used for detection method lining up said detection method of mRNA, and the specific gene loci which bear gene expression in cell.

[0002]

[Prior Art] Polynucleotide (DNA or RNA) sample which become target in solid phase gripping the method of doing. And, bacteria in blood and waste or other sample and method which detect the target polynucleotide of virus or other adventitious, are disclosed in Japan Unexamined Patent Publication Showa 58-31998. With this method, degeneration doing polynucleotide in sample with heating etc after making single strand, it looks this, in nitrocellulose membrane. Next, polynucleotide of bacteria and virus which you want to inspect and corresponding radio active element labeling which has complementary base sequence polynucleotide probe which is done after reacting, this membrane is washed. If polynucleotide of bacteria and virus is included in sample, the labeling polynucleotide probe assembling in this with hybridization reaction, it remains on membrane. presence or absence of target polynucleotide can be decided by fact that this is detected with autoradiography.

[0003] In solid phase as for other method which trapping is done, from the analytical biochemistry 19 Vol.8 (1991) and 138 page method of S. R. lath ムツ plug and other has been stated polynucleotide (DNA or RNA) sample which become target in 142 page (Søren

it ical Biochemistry 198, 128~142 (1991)) にエス. アール. ラスマッセンらの方法が記載されている。この方法では、ポリヌクレオチドの 5' 末端のリン酸基を 1-メチルイミダゾールと 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドを用いて活性化し、表面に 2 級アミンを導入したポリスチレンマイクロプレートに固定する。この方法では 2 級アミンと活性化した 5' 末端のリン酸基が反応するのでポリヌクレオチドの 5' 末端側がマイクロプレート表面に共有結合で固定される。この例では、固定化されたポリヌクレオチドを用いて試料中の標的オリゴヌクレオチドを捕捉することができる。いずれの方法でも、³²P 等で標識したプローブを用いて特定のオリゴヌクレオチドを検出することができる。

[0004]

【発明が解決しようとする課題】特開昭 58-31998 記載のポリヌクレオチド検出法では、標的ポリヌクレオチドをニトロセルロースやナイロン等の担体膜に物理吸着により固定している。担体膜上の単位面積当りの吸着席は限られているので、試料溶液中にタンパク質や目的外のポリヌクレオチド等の夾雑物が多量に含まれると相対的に標的ポリヌクレオチドの固定量が低下する問題点がある。また、ナイロン担体膜等のような布状物質を水溶液中で扱うことは自動化が困難である上、オートラジオグラフィを用いるため標的ポリヌクレオチドの有無の判定がせいぜいフィルムの黒化度から半定量測定が行われるにすぎない。アナリティカル バイオケミストリー 198 巻 (1991 年)、138 頁から 142 頁 (Søren Richard Rasmussen et al, Analytical Biochemistry 198, 128~142 (1991)) 記載のポリヌクレオチド検出法では、標的ポリヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチドを化学的に固定したマイクロプレート担体を用いる。この方法では標的ポリヌクレオチドを特異的に捕捉できるので、上記吸着席の問題は回避できる。また、マイクロプレートを担体として用いるため装置化に際しても対応できる。しかし、測定対象となる標的ポリヌクレオチド毎に相補的なオリゴヌクレオチドを合成し、担体毎に固定する必要があるため、担体調製に手間がかかる問題点がある。また、あらかじめオリゴヌクレオチドを固定したマイクロプレートを準備する都合上、複数の測定対象物に対してランダムアクセスすることが難しい。ランダムアクセス機構は検体ごとに異なる検査項目を処理する上で特に臨床フィールドでは重要である。加えて上記測定方法では標識に放射性同位元素を使用するために、作業者の放射線被曝を考慮する必要がある。臨床フィールドで使用するには不都合な面が指摘されている。本発明は、定量的な測定が可能で、かつ臨床フィールドで複数種の標的ポリヌクレオチドをランダムアクセスが可能で、スループットの高い自動化装置の構築が可能な手法を提供することにある。加えて、本発明では、従来法には無い機能として、転写活性を持つ RNA を選択的に

Richard Rasmussen et al. Analytical Biochemistry (0006-2960, BICHAW) 198, 128 to 142 (1991)). With this method, it activate sphosphoric acid group of 5' end of polynucleotide making use of 1-methyl imidazole and 1-ethyl-3-(3-di methylamino propyl)-carbodiimide, it locks in polystyrene microplate which introduces secondary amine into surface. Because with this method secondary amine phosphoric acid group of 5' end which is activated reacts, 5' terminal side of polynucleotide is locked to microplate surface with the covalent bond. With this example, trapping target oligonucleotide in sample it is possible making use of polynucleotide which is fixed to do. Specific oligonucleotide can be detected even with any method making use of the probe which with such as ³²P labelling is done.

[0004]

[Problems to be Solved by the Invention] With polynucleotide detection method which is stated in Japan Unexamined Patent Publication Showa 58-31998, target polynucleotide is locked in the nitrocellulose and nylon or other support membrane with physical adsorption. Because adsorption seat of per unit surface area on support membrane is limited, when the polynucleotide or other impurity outside protein and object is included in large amount in the sample solution, there is a problem where target polynucleotide quantification decreases relatively hard. In addition as for handling nylon support membrane or other cloth substance in aqueous solution in addition to the fact that automation is difficult, in order to use autoradiography, semi-quantitation measurement only is done from degree of blackening of at very most film whether decision of presence or absence of target polynucleotide. With polynucleotide detection method which from analytical biochemistry 19 Vol 18 (1991) and 138 page is stated in the 142 page (Søren Richard Rasmussen et al, Analytical Biochemistry (0006-2960, BICHAW) 198, 128 to 142 (1991)), microplate support which in target polynucleotide locks complementary oligonucleotide in chemical is used. Because with this method trapping is possible target polynucleotide to specific you can evade problem of above-mentioned adsorption seat. In addition in order microplate to use as support, a time of equipment conversion it can correspond. But, to synthesize complementary oligonucleotide in every target polynucleotide which becomes measurement subject, because it is necessary to lock in every support, there is a problem which requires labor in support preparation. It is difficult vis-a-vis object for measurement of plural in addition, in regard to circumstances which prepare microplate which before had locked oligonucleotide, random access to do. random access mechanism when treating inspection item which differs every type target with the especially clinic field is important. In addition with above-mentioned measurement method in order to

検出できる手段を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明は、標的ポリヌクレオチドがRNAであって、該標的RNAを標識物で標識するとともに担体に固定して標的RNAを検出する方法において、リボソームを固定した担体を用い該標的RNAを捕捉することを特徴とするポリヌクレオチド検出方法にある。ここで、標的RNAの標識は予め標識しておいてもよく、またリボソームを固定した担体に捕捉した後に標識してもよい。

【0006】さらに、本発明は、標的ポリヌクレオチドがDNAであって、該標的DNAを標識物で標識し担体に捕捉して検出する方法において、リボソームを固定した担体を用いるとともに該リボソームに、該リボソームと結合しうるRNA配列及び前記標的DNAに相補的なリンカーポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを結合し、かつ前記リンカーポリヌクレオチドと前記標的DNAとをハイブリダイズさせてポリヌクレオチド会合体を形成させることにより、標的DNAを捕捉することを特徴とする標的ポリヌクレオチドの検出方法にある。ここで、標的DNAの標識は予め標識しておいてもよく、またリボソームを固定した担体に捕捉した後に標識してもよい。

【0007】上記RNAとしてはRNAウイルス、mRNAが挙げられ、リボソームとしては真核生物のリボソームあるいは原核生物のリボソームが挙げられる。また、標識物としては、蛍光体があげられる。さらに、本発明は、少なくとも一種以上の励起光を発射する光源、該光源から発射された励起光のビーム径を拡大するビームエキスパンダー、ビーム径が拡大された励起光を一定方向に曲折させるとともに反応担体が発する蛍光を透過させることのできる鏡、当該鏡により曲折させた励起光を架台上に載置した反応担体上に照射するための集光レンズ、反応担体が発する蛍光を検出する蛍光検出機構、反応担体の下部に該反応担体を透過した励起光を受けるフォトダイオード、前記フォトダイオードの信号が最大となるように反応担体を載置した架台を一定方向に駆動する駆動機構、前記蛍光

use corresponding radioactive element for labelling, it is necessary to consider radiation sickness of worker, uses with clinic field undesirable aspects pointed out. this invention quantitative measurement being possible, at same time the target polynucleotide of multiple kinds random access being possible with clinic field, is too for technique whose construction of automated equipment where the throughput is high is possible. In addition, with this invention, RNA which has copying activity as the function which is not in prior art method, selectively it is to offer the means which can be detected

【0005】

[Means to Solve the Problems] Namely, as for this invention, target polynucleotide being RNA, as said target RNA the labelling is done with label locking in support, regarding the method which detects target RNA, there is a polynucleotide detection method which designates that the gripping it does said target RNA as a feature making use of support which locks ribosome. Here, labelling of target RNA may do labelling beforehand, to support which in addition locks ribosome gripping after doing, labelling too is possible.

【0006】Furthermore, As for this invention, target polynucleotide being DNA, being. In method where labelling it does said target DNA with label the trapping does in support and detects regarding, As support which locks ribosome is used it connects polynucleotide which includes complementary linker polynucleotide in RNA sequence and a forementioned target DNA which it can connect with said ribosome to said ribosome, at same time hybridize doing aforementioned linker polynucleotide and a forementioned target DNA, there is a detection method of target polynucleotide which designates that trapping it does target DNA as a feature by forming polynucleotide aggregate. Here, labelling of target DNA may do labelling beforehand, to support which in addition locks ribosome trapping after doing, labelling too is possible.

【0007】You can list RNA virus and mRNA as above-mentioned RNA, you can list ribosome of eukaryote or ribosome of prokaryotic organism as the ribosome. In addition it can increase phosphorus label. Furthermore, As for this invention, excitation light of at least one kind is discharged light source, Expands beam diameter of excitation light which is discharged from said light source the beam expander - which excitation light where beam diameter is expanded as it bends in constant direction transmitting fluorescence which reaction support gives out it is possible, mirror, To irradiate on reaction support which mounts excitation light which bends with this said mirror on stage condenser lens in order, fluorescence which reaction support gives out is detected fluorescence detection

検出機構からの信号をフォトダイオードからの位置情報と同期させて計数する装置からなることを特徴とする蛍光検出装置にある。

【0008】 先ず、本発明のポリヌクレオチド検出法がRNAウイルス由来のRNAやmRNAに対して適応される場合について説明する。その試料調製法としては、具体的被測定対象の種類に応じ公知の方法を用いることができる。これらRNAは1本鎖であることが多く、多くの場合その5'末端あるいはその近傍にリボソーム結合部位を含む。例えば、真核生物のmRNAは5'末端にキャップ構造を有しこれがリボソームと結合しうる。もちろんこれにはキャップ結合タンパク質とよばれる一群の因子が必要である。あるいは、RNAウイルスの1種であるC型肝炎ウイルスでは5'末端近傍の約330塩基のノンコーディング部位の一部がリボソームと結合しうる。このように5'末端キャップ構造ではなく5'末端近傍のノンコーディング部位がリボソームと結合する他の例としては、ピコナウイルスが知られている。そこで、適当な方法で担体上に固定したリボソームを用意することができれば、これらRNAを捕捉することができる。リボソームを固定した担体の調製法としては、例えば担体としてガラス、光学的に透明なプラスチック、シリコンウエファース、セルロース膜等を用い、表面にシランカップリング反応を用いて官能基を導入しリボソームの官能基との間で架橋することで得られる。例えばアミノ基を導入したガラスとリボソームのアミノ基のあいだをグルタルアルデヒドで架橋することで調製することができる。本発明のポリヌクレオチド検出法がDNA等で直接リボソームと結合できないものに対して適応される場合について説明する。その試料調製法としては、具体的被測定対象の種類に応じた公知の方法を用いることができる。

【0009】 DNA等ではリボソームと結合できるようにする必要がある。あらかじめリボソームと結合しうるRNA配列を含みかつ該標的ポリヌクレオチドに相補的なリンカーポリヌクレオチドを用意し、これを標的ポリヌクレオチドとハイブリダイズさせ標的ポリヌクレオチド会合体を形成させることで標的ポリヌクレオチドにリボソームに結合できる部位を導入する。これにより標的ポリヌクレオチドをリボソームを固定した担体で捕捉できるようになる。

mechanism. In order for signal of photodiode and aforementioned photodiode which receive excitation light which transmitted said reaction support in the bottom of reaction support to become maximum position information and the synchronization from photodiode doing signal from drive mechanism and the aforementioned fluorescence detection mechanism which drive stage which mounts reaction support in constant direction, there is a fluorescence detection apparatus which designates that it consists of equipment which counting is done as a feature.

[0008] First, polynucleotide detection method of this invention you explain concerning when it is adapted vis-a-vis RNA and mRNA of RNA virus derivation. As sample preparation method, rich field known method can be used according to the type of fluorescent object being measured. When as for the RNA are many times when it is a single strand, are mainly the ribosomal binding site is included in 5' end or vicinity. mRNA of for example eukaryote it possess scap structure in 5' end and this connects with ribosome. factor of one group which is called a binding protein of course in this is necessary. Or, with hepatitis C virus which has a kind of RNA virus portion of non coding site of approximately 330 bases of 5' end vicinity can connect with ribosome. This way is not 5' end cap structure and picorna virus is known as there example which non coding site of 5' end vicinity connects with ribosome. Then, if it can prepare ribosome which with suitable method is locked on the support, trapping is possible the RNA. Making use of glass, optically transparent plastic, silicon wafer and cellulose membrane etc as the preparation method of support which locks ribosome, as for example support, it introduces functional group into surface making use of silane coupling reaction it is acquired by fact that crosslinking and it does with functional group of the ribosome. Between amino group of glass and ribosome which introduce for example amino group with glutaraldehyde it can manufacture by fact that crosslinking it does. Directly cannot connect with ribosome polynucleotide detection method of this invention with such as DNA you explain concerning when it is adapted vis-a-vis the which. As sample preparation method known method which responds to type of fluorescent object being measured can be used.

[0009] With DNA etc it is necessary to try to be able to connect with the ribosome. Beforehand RNA sequence which it can connect with ribosome you prepare the complementary linker polynucleotide in implication, and said target polynucleotide target polynucleotide and hybridize do this and you introduce site which by fact that target polynucleotide aggregate is formed can be connected to ribosome in target polynucleotide. Because of this target polynucleotide it reaches point where trapping it is possible with support which locks ribosome.

【0010】本発明で用いられるリボソームは前述のとおり、真核生物のリボソームあるいは原核生物のリボソームであるが、このリボソームには精製されたものの他リボソームを含む動物或いは植物の器官の抽出物も含まれる。このリボソームとして、具体的には小麦胚芽抽出物、肝細胞抽出物、うさぎ等の網状赤血球抽出物、大腸菌抽出物等が用いられる。

【0011】リボソームを固定した担体に捕捉した標的ポリヌクレオチドを検出するには、蛍光体を用いて標的ポリヌクレオチドを標識する。標的ポリヌクレオチドの標識は、標的ポリヌクレオチドをリボソームを固定した担体に捕捉する前でも後でも良い。標識法としては、標的ポリヌクレオチドに相補的な合成オリゴヌクレオチドに蛍光体を導入したものを用意し、これを標的ポリヌクレオチドにハイブリダイゼーション反応により結合させる方法や、標的ポリヌクレオチドが2本鎖の場合、リガーゼ反応を用いて蛍光標識プライマーを導入する方法、ポリメラーゼを用いて蛍光標識ジデオキシリボヌクレオチドを導入する方法などが可能である。

【0012】

【作用】標的ポリヌクレオチドがmRNAやウイルスDNAではそれ自体がリボソームと結合できるので、これら標的ポリヌクレオチドをリボソーム固定担体で捕捉することができる。標的ポリヌクレオチドがDNAなどのリボソームと直接結合できないものでは、リボソームと結合しうる配列のポリヌクレオチドをあらかじめ標的ポリヌクレオチドに結合させることでリボソーム固定担体で捕捉することができる。標的ポリヌクレオチドに標識体を結合させておけば、標的ポリヌクレオチドを中心としたリボソームと標識体のサンドイッチハイブリッドが形成される。この時、リボソームは担体に固定されているので、標識体は標的ポリヌクレオチドの量に相関のある値として担体表面に固定される。よって、担体表面に残存する標識体量を調べることで試料中の標的ポリヌクレオチドの量がわかる。

【0013】標識体としては蛍光体、酵素、化学発光物質、アイソトープ等が利用できる。標識用の蛍光体としては、B-フィコエリスリンやR-フィコエリスリン等のフィコビリプロテイン、ローダミン、フルオレッセイン、4-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール、フタルシアニン等とこれらの誘導体、ならびにこれら蛍光体を含むポリマーを用いることができる。ただし、フィコビリプロテインは熱安定性や変性剤に対する安定性に問題があるため、あらかじめ標的ポリヌクレオチドに会合したブローブにビオチン

【0010】Ribosome which is used with this invention aforementioned, is the ribosome of eukaryote or ribosome of prokaryotic organism but a bo extract of the organ of animal or plant which include other ribosome of those which were refined is included in this ribosome. As this ribosome, it can use wheat germ extract, hepatocyte extract, rabbit or other reticulocyte extract and the E. coli extract etc concretely.

【0011】Target polynucleotide which trapping is done is detected in support which locks the ribosome, target polynucleotide labelling is done making use of phosphor. Labelling of target polynucleotide target polynucleotide before at and is good to support which locks ribosome at after trapping doing. As labelling method, method of preparing those which introduce the phosphor into complementary synthetic oligonucleotide in target polynucleotide, this coming to target polynucleotide with the hybridization reaction. When target polynucleotide is double strand, method of introducing fluorescent label primer making use of ligation reaction, method etc which introduce fluorescent label deoxyribonucleotide making use of polymerase is possible.

【0012】

【Work or Operations of the Invention】Because target polynucleotide with mRNA and virus DNA can connect with the ribosome that itself, the target polynucleotide gripping is possible with ribosome fixed support. target polynucleotide DNA or other ribosome and with any which direct bond it is not possible by the fact that polynucleotide of a arrangement which hit can connect with the ribosome beforehand is connected to target polynucleotide gripping is possible with ribosome fixed support. If labelling body is connected to target polynucleotide, sandwich hybrid of ribosome and labelling body which designates target polynucleotide as center is formed. Because this time, ribosome is locked to support, labelling body is locked to support surface as value which has correlation in quantity of target polynucleotide. Depending, quantity of target polynucleotide in sample understands by the fact that you inspect labelling body quantity which remains in the support surface.

【0013】It can utilize phosphor, enzyme, chemiluminescent substance and isotope etc as the labelling body. As phosphor for labelling, B-phycoerythrin and R-phycoerythrin or other phycoerythrin protein, rhodamine, fluorescein, 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole and phthalocyanine etc the derivative, and polymer which include the phosphor can be used. However, as for phycoerythrin protein because there is a problem in the stability for thermal stability and modification, it is necessary labelling

ーアビジンあるいは、ハプテン-抗ハプテン抗体等を用いて標識する必要がある。また、フルオレッsein等の短波長蛍光体は散乱光や背景光の影響を受けやすいので、かかる蛍光体としてはローダミン系のスルホローダミン101がよい。これら蛍光体のポリヌクレオチドへの結合方法は特に限定されるものではない。例えば、標識プローブを標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズさせて標識するには、標識プローブを用意する必要がある。標識プローブの調製法としてはアミノ基導入試薬で5'末端に蛍光体を標識する方法や、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 968-972 (1985) 記載のアミノ化チミンを用いて任意のチミン位置に蛍光体を導入する方法、あるいは特開昭61-44353号開示の方法、即ちポリヌクレオチドのリン酸基を官能機を有するスルホン酸基に置き換え、この官能基に蛍光体を結合させることにより蛍光標識プローブを調製し、標的ポリヌクレオチドの任意の位置に標識体を導入することができる。

【0014】

【実施例】以下、実施例により本発明を具体的に説明する。ただし、これら実施例は本発明の技術的範囲を限定するものではない。

(実施例1) リボソーム固定担体の調製

本発明のリボソーム固定担体の調製法を示す。使用するリボソームは小麦胚芽抽出物として用いる。この小麦胚芽抽出物はmRNAの情報からペプチドを合成する能力があり(Alexander S. Spirin et al, Science, vol. 242, 1162-1164 (1988))、真核生物由来のmRNAや真核生物に感染するRNAウィルスを捕捉するのに適している。ここでは市販のタンパク質無細胞合成系小麦胚芽抽出物を各0.1 μ g/mlのアプロチニン、ペプスタチン、ロイペプチンと112 mM酢酸カリウム、1.9 mM酢酸マグネシウム、2%グリセリン等を含む40 mMリン酸緩衝液(pH 7.6)で希釈透析して用いる。抽出物の濃度は約10 μ g/mlである。

【0015】これとは別に、リボソーム固定用担体を用意する。図1は反応担体の一実施形態である。担体上に、直径2 mmの反応部2が設けられ周囲のフッ化エチレン樹脂でできた堤1で溶液を保持する構造となっている。かかる反応担体の素材は、リボソームを固定する適当な反応残基が容易に導入可能で、標識物からの信号を検出可能な限りにおいて特に限定されるも

to do in the probe which has ribbles before hand in target polynucleotide making use of the biotin-avidin or hapten-anti-hapten antibody etc. In addition, because fluorescence of other short wave length phosphor is easy to receive influence of the scatter light and background light, sulforhodamine 101 of rhodamine type is good as this phosphor. coupling method to polynucleotide of these phosphor is not something which especially is limited hybridize doing for example labeled probe in target polynucleotide, labeling to do, it is necessary to prepare labeled probe. As preparation method of labeled probe with amino group introducing reagent in 5' end method the labeling of doing phosphor. Method of introducing phosphor into thymine position of option making use of amination thymidine which is stated in Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America (002 784 24) 82, 968-972 (1985). Or method of Japan Unexamined Patent Publication Showa 61-44353 number disclosure. Namely phosphoric acid group of polynucleotide is replaced to sulfonic acid group which possesses the physical sensation machine, fluorescently labeled probe can be manufactured by connecting the phosphor to this functional group, labeling body can be introduced into desired position of target polynucleotide.

【0014】

[Working Example(s)] This invention is explained concretely below, with Working Example. However, the Working Example are not something which limits technological range of the this invention.

(Working Example 1) Manufacturing ribosome fixed support

One preparation method of ribosome fixed support of this invention is shown. ribosome which is used as a wheat germ extract. As for this wheat germ extract there is a capacity which synthesizes peptide from the information of mRNA and (Alexander S. Spirin et al, Science, vol. 242 1162-1164 (1988)), it is suitable for mRNA and the eukaryote of eukaryotic derivation in order trapping to do RNA virus which the infection is done. Here a protinin of each 0.1 g/ml, dilution dialysis doing commercial protein in cell-free synthetic type wheat germ extract with the 40 mM phosphate buffer (pH 7.6) which includes pepstatin, leupeptin and 112 mM potassium acetate, 1.9 mM magnesium acetate and 2% glycerin etc, it uses. concentration of extract is approximately 10 g/ml.

【0015】Separately from this, support for ribosome fixing is prepared. Figure 1 is one embodiment of reaction support. On support, reaction part 2 of diameter 2 mm is provided and has become the structure which keeps solution with Tsutsumi 1 which it is possible with the fluorophore resin of periphery. As for material of this reaction support, suitable reaction residue which blocks

のではない。例えば、ガラス、シリコンウェハー、光学的に平坦な構造を有するプラスチックを用いるのが好ましい。

【0016】本実施例では担体として無蛍光ガラスを用いる例について説明する。先ずガラス担体表面を十分に洗浄し、36 mMの3-(2-アミノエチルアミノプロピル)トリメトキシシラン水溶液中で30分間処理し、水洗後105°Cで1時間風乾する。次に、2.5%グルタルアルデヒド水溶液50 mlで6時間処理し表面を活性化した無蛍光ガラスを得る。次に、前記したリボソーム混合液10 μ lを添加し2時間反応させる。各0.1 μ g/mlのアプロチニン、ペプスタチン、ロイペプチンと112 mM酢酸カリウム、1.9 mM酢酸マグネシウム、0.25 mMスペルミジン、6 mMジチオスレイトール、2%グリセリンを含む40 mMヘプス緩衝液(pH 7.6)で洗浄する。以上の操作でリボソームを含むS30抽出物を固定した無蛍光ガラス担体を得る。ここでは担体にアミノ基を導入した無蛍光ガラスを用いたが、リボソームを固定できる残基を持つものであれば特に限定する必要はないことは前にも述べた。具体的には、表面にアミノ基を持つマイクロプレート(例えば、住友ベークライト株式会社製、アミノプレート)をグルタルアルデヒドで活性化して用いても同様にリボソームを固定した担体を得ることができる。表面を酸化したシリコンウェハーをシランカップリング処理してアミノ基を導入し、グルタルアルデヒドで活性化して用いてもよい。カルボキシル基を持つマイクロプレート(例えば、住友ベークライト株式会社製、カルボプレート)を0.2 M 1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジミドのpH 5~6の水溶液で活性化した後、水洗し、該リボソームを固定してもよい。

(実施例2) リボソーム結合性の特異的RNAの検出

ここでは肝細胞由来のリボソームを実施例1の方法に従い固定したマイクロプレートを用いてC型肝炎ウイルスのRNAを定量検出する例を示す。

【0017】C型肝炎ウイルスのRNAには5'末端近傍に約350塩基長からなるタンパク質非翻訳部位があり、該非翻訳部位をリボソームが認識することが知られている(小原恭子、実験医学vol. 9(増刊)133-138(1991))。試料は濃度既知のC型肝炎ウイルスのRNAを、5 mg/ml牛血清アルブミン、50%ホルムアミド、0.1% SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)、100 μ g/mlキャリアDNA(変性サケDNA)、0.5 M NaCl、

the ribosome easily with introduction, is not something which especially is limited signal from label in limited detectable. It is desirable to use plastic which possesses planar structure in the for example glass, silicon wafer and optical

[0016] With this working example you explain one example which use non fluorescent glass as support. First you wash glass support surface in fully, 30 min treat in 3-(2-aminocethyl aminopropyl) trimethoxysilane aqueous solution of the 36 mM, 1 hour air dry do with 105°C after water wash. 6 hours it treats next with 2.5% glutaraldehyde aqueous solution 50 ml and it obtains non fluorescence glass which activate surface. next, before it adds ribosome mixed solution 10 μ l which was inscribed and the 2 hours reacts. aprotinin of each 0.1 μ g/ml, you wash with 40 mM HEPES buffer (pH 7.6) which includes the pepstatin, leupeptin and 112 mM potassium acetate, 1.9 mM magnesium acetate, 0.25 mM spermidine, 6 mM dithiothreitol and the 2% glycine. Non fluorescent glass support which locks S30 extract which includes ribosome with operation above is obtained. here non fluorescent glass which introduces a amino group into support was used but if it is something which has residue which can lock the ribosome, you expressed that it is not necessary especially to limit ever before. Concretely, activating microplate (for example Sumitomo Bakelite Co., Ltd. (DB 69-055-1106) make a arid amino plate) which has amino group in surface with glutaraldehyde, using, it can acquire support which locks ribosome in same way. silane coupling treatment doing silicon wafer which surface oxidation is done, it introduces a amino group, activate with glutaraldehyde and is possible to use. After activating with aqueous solution of pH 5 to 6 of 0.2 M 1-ethyl-3-(dimethylamino propyl) carbodiimide, the water wash it do as microplate (for example Sumitomo Bakelite Co., Ltd. (DB 69-055-1106) make a arid carbo plate) which has carboxyl group, is good looking the said ribosome.

(Working Example 2) Detection of specific RNA of ribosome binding ability

Here example which RNA of hepatitis C virus quantification is detected is shown making use of microplate which is locked ribosome of hepatocyte derivation in accordance with method of Working Example 1.

[0017] There is a protein non translation site which consists of approximately 350 base length in the 5' end vicinity in RNA of hepatitis C virus, it is known that ribosome recognizes said non translation site, (Ohta Kyoko and Experimental Medicine (0288-5514) vol. 9(supplement) 133-138(1991)). It is something which RNA of concentration known hepatitis C virus, 5 mg/ml bovine serum albumin, the 50% formamide, 0.1% SDS(sodium dodecyl sulfate), 100 μ g/ml carrier DNA

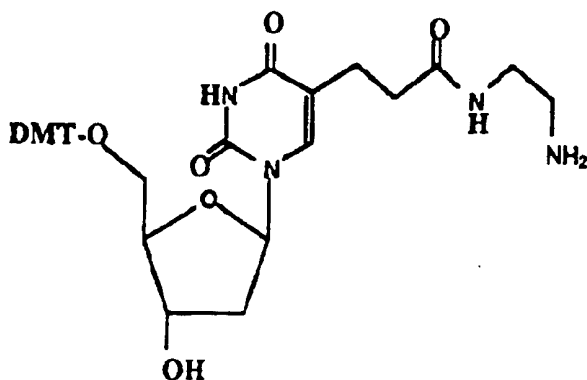
を含む pH 7 の 50 mM ハイブリダイゼーション用バッファーで順次希釈し調製したものである。

【0018】検出に使用する蛍光標識プローブは、配列番号1記載のポリヌクレオチドにスルホローダミン101蛍光体を結合させて用いる。配列番号1のポリヌクレオチドは標的C型肝炎ウイルスのRNAの3'近傍に相補的に結合する。以下該蛍光標識プローブの調製法を説明する。配列番号1の構造の51塩基のポリヌクレオチドをホスホアミダイト法 (Mc Bride, L. J. and Caruthers, M. H., Tetrahedron Letters, vol. 24, 245-348 (1983)) に従い合成する。この際、合成の最終段において、N-モノメトキシトリチルアミノヘキサ-6-オキシ-β-シアノエチル-N, N-ジイソプロピルアミノホスホアミダイトを反応させてアミノ基を5'末端に導入する。また、12番、25番、39番、51番、のチミン残基には、ウリジンの5位にアミノ基を導入した式1記載の

【0019】

【化1】

アミノ化チミジンの構造式



DMT: 4, 4' -ジメトキシトリチル基

【0020】アミノ化チミジンの5' 水酸基を4, 4'-ジメトキシトリチル基保護したものをを用いる。この構造のアミノ化チミジンは Geoffrey B. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 968-972 (1985) の方法に従い調製する。遊離のアミノ基をトリフル

(degeneration salmon DNA) and 0.5M NaCl, serial dilution of the sample with buffer for 50 mM high Bu pH 9 die ze-John of pH 7 which is included manufactures.

【0018】Connecting sulfo rhodamine 101 phosphor to polynucleotide which is stated in Sequence Number 1, it uses fluorescently labeled probe which is used for detection. It connects polynucleotide of Sequence Number 1 to complementary in 3' vicinity of the RNA of target hepatitis C virus. preparation method of said fluorescently labeled probe below is explained. It synthesizes polynucleotide of 5' single base of structure of Sequence Number 1 the phosphoramidite method (in accordance with Mc Bride, L.J. and Caruthers, M.H., Tetrahedron Letters (0040409, TELEAY), vol. 24, 245-348 (1983)). In this case, N-monomethoxytrityl amino hexa-6-oxy-β-cyanoethyl-N,N-diisopropyl amino phosphoramidite reacting in the final step of synthesis, it introduces amino group into 5' end. In addition, 12, 25, 39 and 51 turn, in the thymine residue, it is stated in Formula 1 which introduces amino group into the 5 position of uridine

【0019】

【Chemical Formula 1】

【0020】5' hydroxy group of amination thymidine 4 and 4'-dimethoxytrityl group those which are protected are used. It manufactures amination thymidine of this construction in accordance with method of Geoffrey B. et al, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (0027-8424) 82, 968-

オロアセチル化し、3' 水酸基をクロロ-N,N-ジイソプロピルアミノメトキシホスフィンで活性化して用いる。次に、上記手法により合成した組成ポリヌクレオチドは30%アンモニア水中に溶解している。氷冷下酢酸で中和した後2.5倍容量のエタノールを加え合成ポリヌクレオチドを回収する。沈殿を1M NaClに溶解し再度2.5倍容量のエタノールで沈殿させる。この操作をさらに2回繰り返すことにより、アンモニアや未反応ヌクレオチド等の低分子の反応夾雑物が除かれる。次に合成ポリヌクレオチドを0.5M

炭酸緩衝液 (pH 9) に溶解し、250倍量のスルホローダミン101酸クロライドを添加する。スルホローダミン101酸クロライドはあらかじめアセトニトリルに溶解して使用するが、アセトニトリルは反応時に20%前後になることが重要である。アセトニトリル濃度が高すぎるとポリヌクレオチドが沈殿しやすく、低すぎるとスルホローダミン101酸クロライドが沈殿しやすくなる。遮光下16時間室温で反応させた後、塩酸で中和し、2.5倍容量のエタノールを加え沈殿を回収する。沈殿を1M NaClに溶解し再度2.5倍容量のエタノールで沈殿させる。このようにして調製した粗製のスルホローダミン101標識プローブを50%ホルムアミド共存下で熱変性した後、7M尿素を含む19%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製する。このようにして調製した標識プローブは電気泳動的に単一バンドの純品である。

[0021] 実際のC型肝炎ウィルスのRNAの測定手順について説明する。濃度既知のC型肝炎ウィルスのRNAを含む試料溶液10 μ lに上記手法により調製したスルホローダミン101標識プローブ1pmolを添加し熱変性後ハイブリダイゼーション条件下で30分間放置する。5mg/ml牛血清アルブミン、各0.1 μ g/mlのアプロチニン、ペプスタチン、ロイペプチンと112mM酢酸カリウム、0.5M NaCl、1.9mM酢酸マグネシウム、0.25mMスベルミジン、6mMジチオスレイトール、2%グリセリンを含む40mMヘス緩衝液 (pH 7.6) 90 μ lで希釈し、実施例1記載のリボソーム固定無蛍光ガラス担体に添加する。4時間攪拌した後、5mg/ml牛血清アルブミン、0.05%のTween 20、112mM酢酸カリウム、0.5M NaCl、1.9mM酢酸マグネシウム、0.25mMスベルミジン、2%グリセリンを含む40mMヘス緩衝液 (pH 7.6) で洗浄する。反応の終了した反応担体上の蛍光標識プローブの結合部を検出するには、He/Neレーザー (594nm) (あるいはNaランプなど) と光電子増倍管 (あるいは高感度半導体センサー) を用いて反応担体反応部から発する蛍光を測定する。もちろん他の光源と蛍光体の組み合わせを用いてもよい。本実施例では担体に無蛍光ガラスを用いている。図2に記載のような反射型の蛍光測定装置を

972(1985). To trifluoroacetyl it converts free amino group, activates 3' hydroxy group with chloro-N,N-diisopropyl amino methoxy phosphine and uses. Next, it melts composition polynucleotide which is synthesized with above-mentioned technique in 30% ammonia water. After neutralizing with undecylenic acid, synthetic polynucleotide it recovers including ethanol of 2.5 times volume. It melts precipitation in 1M NaCl and precipitates for the second time with ethanol of 2.5 times volume. Reaction impurity of ammonia and unreacted nucleotide or other low molecular weight is excluded by further more twice repeating this operation. Synthetic polynucleotide is melted in 0.5M carbon dioxide buffer (pH 9) next, sulfo rhodamine 101 acid chloride of the 250 times mol is added. Melting in acetonitrile beforehand, you use sulfo rhodamine 101 acid chloride, but as for the acetonitrile when reacting it is important to be concentrated approximately 20%. When acetonitrile concentration is too high, polynucleotide becomes easy to precipitate, when it is too low sulfo rhodamine 101 acid chloride is easy to precipitate. With 16 hours room temperature under light blocking after reacting, it neutralizes with the hydrochloric acid, precipitation recovers including ethanol of 2.5 times volume. It melts precipitation in 1M NaCl and precipitates for the second time with ethanol of 2.5 times volume. It refines sulfo rhodamine 101 labeled probe of crude which it manufactures in this way the heat-modified after doing, with 19% polyacrylamide-gel electrophoresis which includes 7M urea and 50% formamide coexisting labeled probe which it manufactures in this way is pure product of single band in electrophoretic.

[0021] You explain concerning measurement protocol of RNA of actual hepatitis C virus. It adds sulfo rhodamine 101 labeled probe 1 pmol which is manufactured with above-mentioned technique in sample solution 10 l which includes RNA of concentration known hepatitis C virus and the 30-minute leaves under hybridization condition after heat modified. 5 mg/ml bovine serum albumin, aprotinin of each 0.1 g/ml, it dilutes with 40mM HEPES buffer (pH 7.6) 90 l which includes pepstatin, leupeptin and 112 mM potassium acetate, 0.5M NaCl, 1.9 mM magnesium acetate, the 0.25mM spermidine, 6 mM dithiothreitol and 2% glycerin, it adds to ribosome fixed non fluorescent glass support which is stationary. Working Example 1. 4 hours after reacting, Tween 20, 112 mM potassium acetate of 5 mg/ml bovine serum albumin and 0.05%, you wash with 40mM HEPES buffer (pH 7.6) which includes 0.5M NaCl, 1.9 mM magnesium acetate, 0.25 mM spermidine and the 2% glycerin. board of fluorescently labeled probe on reaction support where reaction ends is detected, fluorescence which is given out from reaction support reaction part the He/Ne laser (594 nm) (Or such as Na lamp) with making use of photomultiplier tube (Or high sensitivity semiconductor sensor) is measured. Of

用いて反応担体上方から測定すると励起光除去が容易なので高感度な測定系が得られる。

【0022】図3に各種濃度のC型肝炎ウイルスRNAの測定結果を実線で示す。なお従来用いられているナイロン膜にC型肝炎ウイルスRNAを直接固定し、本発明で用いたのと同じ蛍光標識プローブを用いて測定を行った結果を破線で示す。従来法でも図2記載の装置を用いて蛍光測定を行ったが、試料反応部を自動的に検出することはできないのでマニュアル操作で測定した。その結果本発明によれば従来法に比べ約1桁高感度に定量測定できることがわかる。測定のダイナミックレンジは4桁以上を確保でき従来法の蛍光法（図3破線）やオートラジオグラフィーを用いた検出法に比べ1桁ないし2桁広い。これらの効果は、主にリボソームを固定する担体に背景光の低いガラスを用いたことによる。また、従来法ではナイロンやニトロセルロース製のメンブレンを担体として使用するため、機械強度が弱く取扱が不便であったが、本発明ではガラスやシリコンウェハー等でできた担体を用いるため自動化に適している。また、本方法が、転写活性のあるポリヌクレオチドのみを選択的に測定できる利点があることを示すために、同様の実験をM13由来のDNAとこれに相補的に結合する蛍光標識プローブを用いて行った。その結果、M13由来のDNAを検出することはできなかった。M13由来のDNAそれ自体は転写活性を持たないので、リボソーム固定担体で捕捉することができない。よって、本発明は、試料中の転写活性のあるポリヌクレオチド、即ち、RNAウイルスやmRNA等を選択的に選別測定できる利点があることが示された。

【0023】（実施例3）本発明のポリヌクレオチドノ検出方法に使用する蛍光検出装置

本発明のポリヌクレオチドの検出方法に使用する蛍光測定装置の一例を図2により説明する。レーザー光源101の光は、ビームエキスパンダー102でビーム径を拡張し、ダイクロイックミラー103で反射される。ダイクロイックミラー103は594nmの光を

course making use of other light source and group corresponding of the phosphor it is good. With this working example non fluorescence glass is used for support. When it measures from reaction support upward direction, making use of fluorescence measuring apparatus of the kind of reflective type which is stated in Figure 2 because excitation light removal is easy, highly sensitive measuring system is acquired.

[002] In Figure 3 measurement result of the hepatitis C virus RNA of various concentration is shown with the solid line. Furthermore the hepatitis C virus RNA is directly locked in nylon membrane which is used until recently, result of measuring making use of same fluorescently labeled probe as those which have used with this invention is shown with dashed line. It measured fluorescence making use of equipment which even with prior art method is stated in Figure 2, but because it is not possible to detect the sample reaction part in automatic, it measured with manual operation. As a result according to this invention in comparison with prior art method what the quantification is possible in approximately 1 order high sensitivity understands. dynamic range of measurement can guarantee above four digits and 1 order or two-digit is wide fluorescence method of prior art method (Figure 3 dashed line) and in comparison with detection method which uses autoradiography. These effects depend on using glass whose background light is low in the support which locks ribosome mainly. In addition, in order with prior art method membrane of nylon and the nitrocellulose make to use, as support mechanical strength to be weak handling was inconvenient, but with this invention in order to use support which is possible with glass and silicon wafer etc it is suitable for automation. In addition, this method selectively in order to show fact that it is the refit which can be measured, did only polynucleotide which has the copying activity similar experiment DNA of M13 derivation making use of fluorescently labeled probe which is connected to complementary in this. As a result, it was not possible to detect DNA of M13 derivation. Because that itself of DNA of M13 derivation does not have the copying activity, gripping it is not possible with ribosome fixed support to do. Depending, as for this invention, selectively it can sort measurement being the refit which was shown polynucleotide, namely RNA virus and mRNA etc which have copying activity in sample.

[0023] (Working Example 3) You use for polynucleotide no detection method of this invention fluorescence detection apparatus

One example of fluorescence measuring apparatus which is used for detection method of polynucleotide of this invention is explained with Figure 2. Light of laser light source 101 expands beam diameter with beam expander-102, is reflected with dichroic mirror 103.

反射し、610 nm以上の光を80%以上透過するものを使用する。ダイクロイックミラー103で反射された光は、スリット109を通過した後、集光レンズ108で集光され、反応担体100の反応部の直径2 mmの範囲を照射する。反応部に蛍光体が存在する部位にレーザースポットがあたると蛍光が発生する。蛍光は集光レンズ108を通り、ダイクロイックミラー103を通過する。バンドパスフィルター110を通過した後、光電子増倍管111で検出される。これとは別に反応担体の下部にはフォトダイオード120が配置されている。反応担体の反応部ではレーザー光が反応担体を透過しフォトダイオードに達するが、フッ化エチレン樹脂堤の部分は光の透過率が低下する。フォトダイオード120の信号が最大になるように駆動機構132を用いて反応担体の反応部を自動的に検索できる。光電子増倍管111検出された信号は、マイクロプロセッサ151に取り込まれ、フォトダイオードからの位置情報と同期させて処理することで、各反応部における蛍光強度を算出する。この方法で、反応部毎の蛍光強度を測定できる。

【0024】（実施例4）特異的DNAの検出

ここでは実施例2記載のリボソーム固定無蛍光ガラス担体を用いて直接リボソームと結合することのできないDNAを検出する例を示す。標的DNAは2本鎖のM13mp18とバクテリオファージλのEcoRI分解物である。両者は本方法のランダムアクセス性を示すために同一反応担体上の異なる反応部で同時に測定を行う。

【0025】M13mp18やバクテリオファージλはDNAであるので、C型肝炎ウィルスのRNAのようなリボソームとの結合部位をもたない。そこでリボソームとの結合部位を導入する必要がある。そこでこれら標的DNAとリボソームに結合しうるリンカーポリヌクレオチドを用いる。M13mp18用のリンカーポリヌクレオチドは配列番号2の構造の物で、ホスホアミダイト法 (Mc Bride, L. J. and Caruthers, M. H., Tetrahedron Letters, vol. 24, 245-348 (1983)) に従い合成する。もちろん目的のリンカーが得られる限りにおいて合成法は限定されるものではない。リンカーポリヌクレオチドの5'末端から350番目の塩基まではC型肝炎ウィルスRNAの5'末端の非翻訳領域である。357番目から3'末端側の37塩基はM13mp18に相補的な配列である。351番目から356番目の配列はAAGCTTで制限酵素Hind IIIの切断部位で、必要に応じて標的となるポリヌクレオチドに相補的な他のプローブを導入できる構造となっている。バクテリオ

dichroic mirror 103 reflects light of 594 nm use those which light of the 610 nm or greater 80% or higher are transmitted. Light which is reflected with dichroic mirror 103 after passing slit 109, the light collection is done with condenser lens 108 irradiate range of diameter 2 mm of the reaction part of reaction support 100. When laser spot hits to site where phosphor exists in reaction part the fluorescence occurs. fluorescence passes by condenser lens 108, passes dichroic mirror 103. After passing bandpass filter 110, it is detected with photomultiplier tube 111. photodiode 120 is arranged separately from this in bottom of the reaction support. With reaction part of reaction support laser light transmits reaction support and reaches to photodiode, but a small portion of fluorescence resin Tsutsumi the transmittance of light decreases. In order for signal of photodiode 120 to become maximum, reaction part of the reaction support can be searched in automatic making use of the drive mechanism 132. photomultiplier tube 111 signal which is detected is taken in by microprocessor 151, the position information and synchronization from photodiode does so and by fact that it treats, calculates fluorescence intensity in each reaction part. With this method fluorescence intensity every of reaction part can be measured.

[0024] (Working Example 4) Detection of specific DNA

Example which detects DNA which directly cannot connect with the ribosome here making use of ribosome fixed on nonfluorescence glass support which is stated in Working Example 2 is shown. target DNA is M13mp18 of double strand and EcoRI lysate of bacteriophages. both measure simultaneously with reaction part where top of the same reaction support in order to show random access characteristic of this method differs.

[0025] Because M13mp18 and bacteriophages are DNA, it does not have the binding site of ribosome like RNA of hepatitis C virus. It is necessary to introduce binding site of ribosome then linker polynucleotide which it can connect to the target DNA and ribosome the nucleus. It synthesizes linker poly(jp10) clay enzyme jp8 for M13mp18 with those of the structure of Sequence Number 2, phosphoramidite method (in accordance with Mc Bride, L.J. and Caruthers, M.H., Tetrahedron Letters (0040409, TELEAY), vol. 24, 245-348 (1983)). Of course if linker of objective is acquired, synthetic method is not something which is limited in. To base of 350th it is an untranscribed region of 5' end of hepatitis C virus RNA from the 5' end of linker polynucleotide. From 357th 37 base of 3' terminus side is complementary sequence in M13mp18. From 351st arrangement of 356th with cleavage site of restriction enzyme Hind III, has the same structure which can introduce complementary other probe into the polynucleotide which becomes according to need target

アージュスのEcoRI分解物に相補的なリンカーポリヌクレオチドは、上記C型肝炎ウイルスRNAの5'末端の非翻訳領域に配列番号3記載のオリゴヌクレオチドを結合したものである。配列番号3記載のオリゴヌクレオチドは5'末端に制限酵素HindIII切断部位を含み、バクテリオファージュのEcoRI分解物に相補的な配列のポリヌクレオチドである。

【0026】標的ポリヌクレオチドであるM13mp18とバクテリオファージュのEcoRI分解物はあらかじめ蛍光標識して用いる。目的とするM13mp18とバクテリオファージュをEcoRIで切断し、切断部に蛍光体を導入する。蛍光体導入法には蛍光標識ヌクレオチドモノマーをDNAポリメラーゼで導入する方法、蛍光標識付きオリゴヌクレオチドをライゲーション反応でつける方法、あるいは全DNA鎖にビオチンを導入し蛍光標識アビジン等を結合させる方法やエテノ化反応によりDNA自身を蛍光性に変換する方法があるが、ここではライゲーションによる蛍光標識オリゴマーの導入を行う。ここで使用する蛍光標識オリゴマーは配列番号4記載の構造の2本鎖DNAで、3'末端は制限酵素EcoRIの切断部位に一致する。5'末端と5'末端から12塩基目、24塩基目にはスルホローダミン101蛍光体が結合している。スルホローダミン101の標識法は前記実施例1における標的C型肝炎ウイルスのRNAの3'近傍に相補的に結合する該蛍光標識プライマーの調製法に従う。即ち、該蛍光標識部位の塩基としてアミノ化チミンを用いてオリゴマーを合成し、該アミノ基にスルホローダミン101酸クロライドで修飾した物である。実際のM13mp18とバクテリオファージュのEcoRI分解物の測定手順について説明する。スルホローダミン101標識した濃度既知のM13mp18とバクテリオファージュを含む試料溶液10μlに上記手法により調製したリンカーポリヌクレオチド1pmol(1μl)を添加し56℃ハイブリダイゼーション条件下で6時間放置する。5mg/ml牛血清アルブミン、各0.1μg/mlのアプロチニン、ペプスタチン、ロイペプチンと112mM酢酸カリウム、0.5M NaCl、1.9mM酢酸マグネシウム、0.25mMスベルミジン、6mMジチオスレイトール、2%グリセリンを含む40mMヘス緩衝液(pH7.6)90μlで希釈し、実施例1記載のリボソーム固定無蛍光ガラス担体に添加する。4時間反応させた後に、5mg/ml牛血清アルブミン、0.05%のTween20、112mM酢酸カリウム、0.5M NaCl、1.9mM酢酸マグネシウム、0.25mMスベルミジン、2%グリセリンを含む40mMヘス緩衝液(pH7.6)で洗浄する。

with AAGCTT. complementary linker polynucleotide is something which connects oligonucleotide which in untranscribed region of the 5' end of above mentioned hepatitis C virus RNA is stated in Sequence Number 3 in the EcoRI lysate of bacteriophages. oligonucleotide which is stated in Sequence Number 3 including restriction enzyme Hind III cleavage site in the 5' end, is polynucleotide of complementary sequence in EcoRI lysate of bacteriophages.

【0026】Fluorescent label doing beforehand, it uses EcoRI lysate of M13mp18 and the bacteriophages which are a target polynucleotide. M13mp18 and bacteriophages which are made objective are cut off with the EcoRI. phosphorus introduced into cut portion. In phosphor introduction method method of introducing fluorescent label nucleotide monomer with DNA polymerase. Method of attaching fluorescent label equipped oligonucleotide with ligation reaction. Or it introduces there is a method which converts DNA itself to the fluorescence with method and エテノ conversion reaction which connects fluorescent label label etc here, but biotin into whole DNA chain and a red fluorescent label oligomer with the ligation introduction. As for fluorescent labeling of oligomer which is used here with double strand DNA of structure which is stated in Sequence Number 4, 3' end agrees to cleavage site of restriction enzyme EcoRI. sulfo rhodamine 101 phosphorus connected to secondary salt basic eye and 24 base eye from the 5' end and 5' end. labeling method of sulfo rhodamine 101 you follow preparation method of said fluorescent label primer which is connected to complementary in 3' vicinity of RNA of target hepatitis C virus in the aforementioned Working Example 1. Namely, as base of said fluorescence labeling site it is something which synthesizes the oligomer making use of amination thymidine, in said amino group decorate with the sulfo rhodamine 101 acid chloride. You explain concerning measurement protocol of EcoRI lysate of actual M13mp18 and the bacteriophages. It adds linker polynucleotide 1 pmol(1 μl) which is manufactured with above mentioned technique in concentration known M13mp18 which sulfo rhodamine 101 labeling is done and a red sample solution 10 μl which includes bacteriophages 6 hours leaves under 56 °C hybridization condition. 5 mg/ml bovine serum albumin, a protein of each 0.1 μg/ml, it dilutes with 40mM HEPES buffer (pH 7.6) 90 μl which includes pepstatin, leupeptin and 112 mM potassium acetate, 0.5M NaCl, 1.9 mM magnesium acetate, the 0.25mM spermidine, 6 mM dithiothreitol and 2% glycerin, it adds to ribosome fixed non fluorescent glass support which is stated in Working Example 1. After 4 hours reacting, Tween 20, 112 mM potassium acetate of 5 mg/ml bovine serum albumin and 0.05% you wash with 40mM HEPES buffer (pH 7.6) which includes 0.5M NaCl, 1.9 mM magnesium acetate, 0.25 mM spermidine and the 2%

【0027】反応の終了した反応担体上の蛍光標識プローブの結合部を検出するには、実施例2と同様にHe/Neレーザー（594nm）（あるいはNaランプなど）と光電子増倍管（あるいは高感度半導体センサー）を用いて図2に記載の反射型の蛍光測定装置を用いて反応担体反応部から発する蛍光を測定する。図4に各種濃度のM13mp18とバクテリオファージλのEcoRI分解物の測定結果を示す。その結果本発明によれば、M13mp18とバクテリオファージλのEcoRI分解物を定量的に測定できる。また、蛍光が検出された反応部を加熱し、遊離して来るポリヌクレオチドを蛍光式電気泳動で分析したところ、M13mp18を反応させた反応部からはM13mp18由来の約7200塩基長の蛍光標識ポリヌクレオチドが検出された。また、バクテリオファージλのEcoRI分解物を反応させた反応部からは、バクテリオファージλのEcoRI分解物由来の約7400塩基長の蛍光標識ポリヌクレオチドが検出された。このように、リボソームに直接結合しないようなDNA等でも本発明のリンカーポリヌクレオチドを用いることで捕捉できるようになるので、任意のDNA等をリボソーム固定担体を用いて測定できる。また、任意の測定対象物を同一担体上で測定出来るので異なる測定対象物にたいしてランダムアクセス出来る利点があるので、本リボソーム固定担体を用いる方法は自動化に適している。

【0028】また、本発明ではガラスやシリコンウェハー等でできた担体を用いるため自動化に適している。

【0029】

【発明の効果】本発明により、放射性同位元素を用いずに試料中のウイルスなどの被測定ポリヌクレオチドを感度よく定量測定することが可能となる。さらに、本発明では、任意の試料ポリヌクレオチドを単一の試料捕捉用担体で共通に測定可能である利点があるので、ランダムアクセスが可能な自動化に適した標的ポリヌクレオチド測定法が提供される。また、本発明では、転写活性のあるRNAを選択的に捕捉検出できる利点がある。

【0030】

glycerin.

【0027】 Bond of fluorescently labeled probe on reaction support where reaction needs is detected, in same way as Working Example 2 fluorescence which is given out from reaction support reaction part making use of fluorescence measuring apparatus of reflective type which is stated in Figure 2. He/Ne laser (594 nm) (Or such as Na lamp) with making use of photomultiplier tube (Or high sensitivity semiconductor sensor) is measured. M13mp18 of various concentration and measurement result of EcoRI lysate of bacteriophages are shown in Figure 4. As a result according to this invention EcoRI lysate of M13mp18 and the bacteriophages can be measured in quantitative. In addition, reaction part where fluorescence is detected was heated, when the polynucleotide which separates was analyzed with fluorescence type electrophoresis, the fluorescence labeling polynucleotide of approximately 7200 base length of M13mp18 derivation was detected the M13mp18 from reaction part which reacts. In addition, fluorescence labeling polynucleotide of approximately 7400 base length of EcoRI lysate derivation of the bacteriophages was detected EcoRI lysate of bacteriophages from reaction part which reacts. This way in ribosome trapping it is possible by fact that the linker polynucleotide of this invention is used even such kind of DNA which the direct bond is not done because it reaches point where, DNA etc of the option can be measured making use of ribosome fixed support. In addition, because object of measurement of option can be measured on the same support, because there is a benefit which random access can be made very the object of measurement which differs, method which uses this ribosome fixed support is suitable for automation.

【0028】 In addition, with this invention in order to use support which it is possible with glass and silicon wafer etc it is suitable for automation.

【0029】

【Effect of the Invention】 With this invention, without using corresponding radioactive element virus or other suffering measurement polynucleotide in sample sensitivity to be good quantification it becomes possible to do. Furthermore, with this invention, because there is a benefit which is a measurable commonly with support for single sample gripping, target polynucleotide measurement method which is suited for the automation where random access is possible is offered sample polynucleotide of the option. In addition, with this invention, RNA which has copying activity these selectively gripping there is a benefit which can be detected.

【0030】

【配列表】

配列番号 : 1

配列の長さ : 51

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 標識物を含む合成ポリヌクレオチド

配列 :

GCCTATTGGCCTGGAGTGTATCTCCCGTTCATCGGTTGGGGAG
CAGGT

配列番号 : 2

配列の長さ : 393

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成ポリヌクレオチド

配列 :

CGAUUGGGGGCGACACUCCACCAUAGAUCACUCCCC 36

UGUGAGGAACUACUGUCUUCACGCAGAAAGCGUCUA 72

GCCAUGGCGUUAGUAUGAGUGUGCGAGCCUCCAG 108

GACCCCCCUCCCGGAGAGCCAUAGUGGUCUGCGG 144

AACCGGUGAGUACACCGGAAUUGCCAGGACGACCGG 180

GUCCUUUCUUGGAUCAACCCGCUCAAUGCCUGGAGA 216

UUUGGGCGUGCCCCCGGAGACUGCUAGCCGAGUAG 252

UGUUGGGUCGCGAAAGGCCUUGUGGUACUGCCUGAU 288

AGGGUGCUUGCGAGUGCCCCGGGAGGUCUCGUAGAC 324

< sequence table >

Sequence Number : 1

Length of sequence : 51

Form of sequence : Nucleic acid

Number of strands : Single strand

Topology : Straight chain

Kind of sequence : Include label synthetic polynucleotide which

Arrangement :

GCCTATTGGCCTGGA GTGT TTA TCT CCCC GT
TCATCG GT TGGGGAGCAG GT

Sequence Number : 2

Length of sequence : 393

Form of sequence : Nucleic acid

Number of strands : Single strand

Topology : Straight chain

Kind of sequence : Synthetic polynucleotide

Arrangement :

CGAUUGGGGGCG ACA CUCCACCAUAGAUC ACUCC
CC 36UGUGAGGAACUACUGUCUUCACGCAGAAAGCGUCU
A 72GCCAUGGCGUUAGUAUGAGUGUGCGAGCCUCC
AG 108GACCCCCCUCCCGGAGAGCCAUAGUGGUCUGC
GG 144AACCGGUGAGU ACA CCGGAAUUGCCAGGACGACC
GG 180GUCCUUUCUUGGAUCAACCCGCUCAAUGCCUGGAG
A 216UUUGGGCGUGCCCCCGGAGACUGCUAGCCGAGU
AG 252UGUUGGGUCGCGAAAGGCCUUGUGGUACUGCCUG
AU 288

AGGGUGCUUGCGAGUGCCCCGGGAGGUCUCGUAG

CGUGCACCAUGAGCACGAAUCCUAAAAAGCTTGT 360

TCCGAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT 393

配列番号 : 3

配列の長さ : 43

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成ポリヌクレオチド

配列 :

AAGCTTATTGCATAATCTTTCAGGGTTATGCGTTGTTCCATAC

配列番号 : 4

配列の長さ : 32

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖を含む2本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 標識物を含む合成ポリヌクレオチド

配列 :

AAACAGATCACTCGCTGAGCGGTTATGGTTG

TTTGTCTAGTGAGCGACTCGCCCAATACCAACTTAAG

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明に使用するリボソーム固定担体を示す図である。

【図2】 本発明での蛍光測定装置を示す図である。

【図3】 C型肝炎ウイルスの測定結果を示す図である。

AC 324

CGUGCACCAUGAGCACGAAUCCUAAAAAGCTTGT
TTT 360TCCCA GTC AC GAC GT T GTA AAACGACGGCCA G
T 393

Sequence Number : 3

Length of sequence : 43

Form of sequence : Nucleic acid

Number of strands : Single strand

Topology : Straight chain

Kind of sequence : Synthetic polynucleotide

Arrangement :

AAGCTTATTGCATAA TCT TTCAGG GT TATGC G
TTGT TCCATAC

Sequence Number : 4

Length of sequence : 32

Form of sequence : Nucleic acid

Number of strands : Single strand is included double strand

Topology : Straight chain

Kind of sequence : Include label synthetic polynucleotide which

Arrangement :

AAACA GATCA C TCGCT GAGCGG GT TATG GT T
GTTT GTC TA GT GAGCGA CT CGCCCAATACCAA C
T TAAG

[Brief Explanation of the Drawing(s)]

[Figure 1] It is a figure which shows ribosome fixed support which is used for the invention.

[Figure 2] It is a figure which shows fluorescence measuring apparatus with this invention.

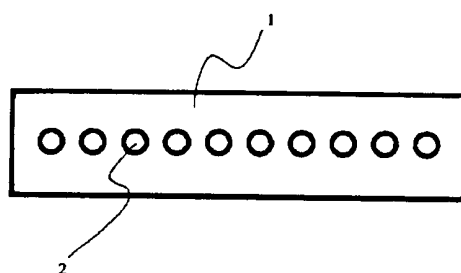
[Figure 3] It is a figure which shows measurement result of hepatitis C virus.

【図 4】 M13mp18 とバクテリオファージの EcoRI 分解物の測定結果を示す図である。

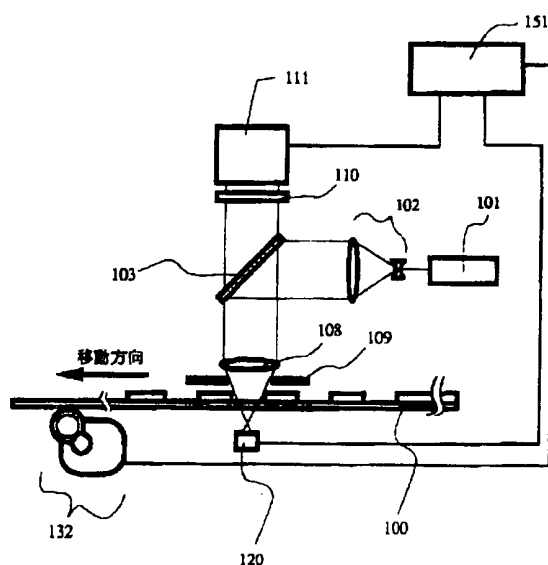
【符号の説明】

1...フッ化エチレン樹脂堤、2...反応部、100...反応担体、101...He/Neレーザー、102...ビームエキスパンダー、103...ダイクロイックミラー、108...集光レンズ、109...スリット、110...バンドパスフィルター、111...光電子増倍管、120...フォトダイオード、131...架台、132...駆動機構、151...マイクロプロセッサ

【図 1】



【図 2】



[Figure 4] It is a figure which shows measurement result of EcoRI lysate of M13mp18 and the bacteriophages

[Explanation of Reference Signs in Drawings]

1... fluorocethylene resin Tsutsumi, 2... reaction part and 100... reaction support, 101...He/Ne laser and 102... beam expander -, 103 ... dichroic mirror, 108... condenser lens, 109... slit, 110 ... bandpass filter, 111 ... photomultiplier tube, 120... photodiode, 131 ... stage, 132... drive mechanism and 151... microprocessor

[Figure 1]

[Figure 2]